Thesis Title Molecular Characterization of Single Chain Variable Fragment Specific to HIV-1 Protease Substrate for the Design of Baculovirus-Displayed Method and Simplified Protease Activity Assay

Author Ms. Kuntida Kitidee

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Advisor

Prof. Dr. Pierre Boulanger Co-advisor

Prof. Dr. Watchara Kasirerk Co-advisor

ABSTRACT

The highly active antiretroviral therapy (HAART), a standard regimen for HIV-1 treatment, provokes adverse side effects and favors the emergence of drug-resistant virus strains. As a consequence, new therapeutics are continuously needed to control HIV replication, and alternative strategies to HAART are being investigated worldwide. Among these, the antibody-based therapy using intracellular antibodies (or intrabodies) and gene therapy represent promising therapeutic approaches. In this study, we aim to characterize the key amino acid residues of a single chain variable fragment (scFv) which interact with the matrix protein (MA) of HIV-1 (scFv-MA HB-8975), to genetically engineer scFv-MA HB-8975 and generate a baculovirus-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

displayed version, and to apply the epitope specificity of the monoclonal anti-MA antibody HB-8975 (anti-MA mAb HB-8975) for the development of a simplified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the HIV-1 protease (HIV-PR) activity.

The specific residues of scFv-MA HB-8975 which play a crucial role in its effective binding to the HIV-1 MA epitope locating on the complementarity determining regions (CDRs) were identified using computer-assisted modeling. The interaction between scFv-MA HB-8975 and wild-type or mutant peptide epitopes were correlated between the predicted information and the data from our peptide-based ELISA. This information will lead to the development of HB-8975-derived scFv with a higher affinity towards the MA substrate, and these new anti-MA scFv molecules will also cover a broad range of HIV-1 variants. In the second study, a recombinant baculovirus producing scFv-MA HB-8975 (abbreviated BV-scFv-MA HB-8975) was constructed. We identified a novel N-terminal leader peptide, an octadecapeptide with the sequence: ^{1}MEASLAAQAAQIQLVQSG^{18}, which efficiently addressed and displayed the scFv molecules to baculovirus. Importantly, the BV-displayed scFv-MA HB-8975 had the same reactivity towards the identified MA epitope as free scFv-MA HB-8975. Our octadecapeptide leader peptide will be used to generate a vehicle of baculovirus vectors displaying anti-HIV scFv with capability to deliver scFvs intrabody into human cells, and to negatively interfere with certain steps of the HIV-1 life-cycle, e.g. assembly and maturation. It was observed that the anti-MA mAb HB-8975 specifically binds to the free C-terminal peptide of the MA domain, rendered accessible after the proteolytic cleavage of the Gag

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

precursor by the HIV-PR. Taking advantage of this property, we have successfully developed a simplified ELISA-based assay for determining the HIV-PR activity namely ELIS-based HIV-PR activity assay or ELIB-PA using an oligoHistidine-tagged HIV-1 Gag polyprotein MAp17-CAp24 (abbreviated H_6MA-CA) as the specific substrate for HIV-PR. ELIB-PA is capable to determine the susceptibility of HIV-PR to different protease inhibitors (PIs), by measuring the median 50% inhibitory concentration (IC_{50}). The ELIB-PA will be applied to investigate the degree of drug-susceptibility of HIV-PR from drug-resistance patients, testing different types of PIs prior to a drug regimen administration. In addition, ELIB-PA will be provided as a high-throughput (HTP) screen to identify novel PIs, and thus will improve and accelerate the drug discovery process in the pharmaceutical industry.

We speculate that the provision of these discoveries will remarkably contribute to the HIV therapeutic research activities as a consequence.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุลของซิงเกิลเชนแวริเอเบิลแฟรกเมนต์ที่จำเพาะต่อสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์โปรตีเอสจากไวรัสเอชไอวี-1 เพื่อออกแบบวิธีการสร้างเทคนิคแบบคิวโลไวรัสดิสเพลย์ และวิธีทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสอย่างง่าย

ผู้เขียน นางสาวกุลธิดา กิติดี

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Pierre Boulanger	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การรักษาระยะยาวด้วยยาต้านไวรัสสูตร highly active retroviral therapy (HAART) ซึ่งถือเป็นมาตราฐานในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 มีผลทำให้เกิดอาการข้างเคียงต่อผู้ป่วย และเกิดการกลายพันธุ์อันนำไปสู่ปัญหาการดื้อยาได้ ดังนั้นแนวทางการรักษารวมถึงวิธีการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีจึงยังเป็นที่ต้องการ ซึ่งในปัจจุบันวิธีการรักษารูปแบบใหม่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทั่วโลกโดยส่วนใหญ่อยู่ในระหว่างการค้นคว้าและพัฒนา ซึ่งการรักษาในระดับเซลล์โดยอาศัยโมเลกุลของแอนติบอดีและการรักษาในระดับยีนถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีความเป็นไปได้ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี จึงนำไปสู่วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาคุณลักษณะของกรดอะมิโนที่สำคัญของซิงเกิลเชนแวริเอเบิลแฟรกเมนต์ (scFv-MA HB-8975) ซึ่งจับกับโปรตีนแมทริกซ์ของเชื้อเอชไอวี-1 (HIV MA), เพื่อออกแบบโมเลกุล scFv-MA HB-8975 และสร้างแบคิวโลไวรัสดิสเพลย์, และเพื่อประยุกต์ใช้แอนติบอดีที่จับอย่างจำเพาะกับโปรตีนแมทริกซ์ (anti-MA HB-8975) เพื่อการพัฒนาวิธีทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อเอชไอวี-1 (HIV-PR) อย่างง่ายโดยอาศัยหลักการทดสอบแบบอีไลซา

ด้วยวิธีการคำนวณและการทำนายด้วยคอมพิวเตอร์ ทำให้ทราบถึงกรดอะมิโนจำเพาะของ scFv-MA HB-8975 ที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการจับกับ HIV MA และอยู่ในส่วน CDRs ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโน นอกจากนี้ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระหว่าง scFv-MA HB-8975 และเปปไทด์แมทริกซ์ต้นแบบหรือเปปไทด์แมทริกซ์กลายพันธุ์จาก ทั้งข้อมูลสมมติด้วยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์และการทดลองโดยอาศัยวิธีอีไลซาให้ผลที่สอดคล้องกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้พัฒนา scFv-MA โมเลกุลใหม่ที่สามารถจับกับ HIV MA ได้ดีขึ้นและครอบคลุมกับเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์อื่นด้วย ในการศึกษาส่วนที่สอง ได้ทำการสร้างรีคอมบิแนนเบคิวโลไวรัสที่สามารถผลิต scFv-MA HB-8975 (BV-scFvMA HB-8975) โดยได้ค้นพบเปปไทด์นำส่งชนิดใหม่ที่เชื่อมต่อกับส่วนปลายของหมู่อะมิโนบนโมเลกุล scFv-MA HB-8975 ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 18 กรดอะมิโนดังนี้ ^{1}MEASLAAQAAQI-QLVQSG[18] โดยเปปไทด์ดังกล่าวสามารถนำส่งและแสดงออกของโมเลกุล scFv-MA HB-8975 บนผิวเปลือกหุ้มของแบคิวโลไวรัสได้ นอกจากนี้ยังพบว่า scFv-MA HB-8975 ที่แสดงออกบนผิวเปลือกหุ้มของแบคิวโลไวรัสมีคุณสมบัติในการจับกับ HIV MA เหมือนกับ scFv-MA HB-8975 ชนิดที่เป็นโมเลกุลอิสระ ดังนั้นเปปไทด์นำส่งที่ถูกค้นพบใหม่นี้สามารถนำไปพัฒนาการสร้างแบคิวโลไสรัสที่มีการแสดงออกของ scFv ที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีบนผิวเปลือกหุ้มได้ และนำไปประยุกต์ใช้ในการขนส่งยีน scFv เข้าสู่เซลล์มนุษย์ เพื่อขัดขวางวงจรชีวิตของเชื้อเอชไอวีในกระบวนการประกอบอนุภาคและการสร้างไวรัสที่สมบูรณ์ ในระหว่างการศึกษาครั้งนี้พบว่า anti-MA HB-8975 มีคุณสมบัติพิเศษในการจับอย่างจำเพาะกับ HIV MA ที่มีปลายกรดคาร์บอกซิลอิสระ ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากโปรตีนต้นแบบ Gag ถูกตัดด้วย HIV-PR เท่านั้น ด้วยคุณลักษณะพิเศษนี้ทำให้ประสบผลสำเร็จในการออกแบบและสร้างวิธีการทดสอบการทำงานของ HIV-PR อย่างง่ายขึ้น เรียกว่า ELIS-based HIV-PR activity assay หรือ ELIB-PA โดยใช้สารตั้งต้นที่จำเพาะคือ โปรตีนแมทริกและแคบสิดของเชื้อเอชไอวีที่ถูกเชื่อมด้วยกรดอะมิโนฮีสติดีน (H_6MA-CA) นอกจากนี้ ELIB-PA ยังสามารถตรวจหาความไวต่อยายับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (PI) ชนิดต่างๆ โดยวัดจากความเข้มข้นของ PI ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ HIV-PR ได้ 50% (IC_{50}) และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น การตรวจสอบระดับความไวต่อ PI หลากหลายชนิด ของ HIV-PR จากผู้ป่วยที่เกิดการดื้อยาก่อนการให้ยาสูตรใหม่ และพัฒนาให้เป็นวิธีการคัดกรองและค้นหา PI ชนิดใหม่ในปริมาณมาก ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาและเพิ่มความเร็วในกระบวนการตรวจหายา PI ชนิดใหม่ในระบบอุตสาหกรรมยา

โดยผลการศึกษาค้นคว้าทั้งหมดนี้ได้นำมาซึ่งองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์และสามารถนำไปต่อยอดการวิจัยเพื่อพัฒนาการรักษาการติดเชื้อเอชไอวีในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved